

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C07K 14/075, A61K 39/235, C12N 7/01		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/12030
			(43) Date de publication internationale: 25 avril 1996 (25.04.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01326		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(22) Date de dépôt international: 11 octobre 1995 (11.10.95)			
(30) Données relatives à la priorité: 94/12346 17 octobre 1994 (17.10.94) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LEE, Martin [GB/FR]; 9, rue Sampaix, F-75010 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR).			
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	

(54) Title: DEFECTIVE ADENOVIRUSES INCLUDING A THERAPEUTIC GENE AND AN IMMUNOPROTECTIVE GENE

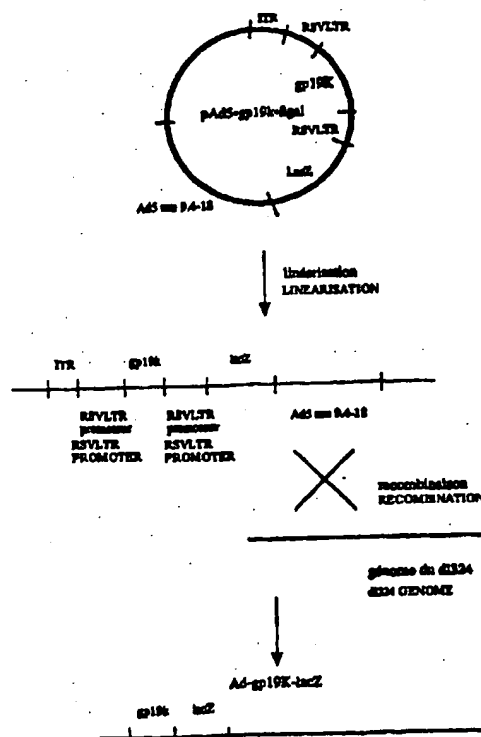
(54) Titre: ADENOVIRUS DEFECTIFS COMPRENANT UN GENE THERAPEUTIQUE ET UN GENE IMMUNOPROTECTEUR

(57) Abstract

Novel adenovirus-derived viral vectors, the preparation thereof, and the use of such vectors in gene therapy, are disclosed. In particular, defective adenoviruses having a genome that includes a first recombinant DNA containing a therapeutic gene and a second recombinant DNA containing an immunoprotective gene, are disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux dérivés des adénovirus, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique. Elle concerne plus particulièrement des adénovirus défectifs dont le génome comprend un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique et un second ADN recombinant contenant un gène immunoprotecteur.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS DEFECTIFS COMPRENANT UN GENE THERAPEUTIQUE ET UN GENE IMMUNOPROTECTEUR

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques contenant lesdits vecteurs viraux. Plus particulièrement, la présente invention concerne des adénovirus recombinants comme vecteurs pour la thérapie génique.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Parmi ces virus, les adénovirus présentent certaines propriétés intéressantes pour une utilisation en thérapie génique. Notamment, ils ont un spectre d'hôte assez large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes et ne s'intègrent pas au génome de la cellule infectée. Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée-répétée (ITR) à leur extrémité, une séquence d'encapsidation, des gènes précoces et des gènes tardifs (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont les gènes E1 (E1a et E1b), E2, E3 et E4. Les principaux gènes tardifs sont les gènes L1 à L5.

Compte tenu des propriétés des adénovirus mentionnées ci-dessus, ceux-ci ont déjà été utilisés pour le transfert de gènes in vivo. A cet effet, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes (β -gal, OTC, α -1AT, cytokines, etc). Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de

manière à le rendre incapable de réplication dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés des régions E1 (E1a et/ou E1b) et éventuellement E3 au niveau desquelles est insérée une séquence d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161).

Cependant, comme pour tous les virus connus, l'administration d'un adénovirus sauvage induit une réponse immunitaire importante (Routes et al., J. Virol. 65 (1991) 1450). Cette immunogénicité a également été observée consécutivement à l'administration d'adénovirus recombinants défectifs pour la réplication (Yang et al., PNAS (1994) 4407). L'un des rôles majeurs du système immunitaire consiste en effet à détruire les éléments non-soi ou soi-altéré. L'administration d'un vecteur de thérapie génique d'origine adénovirale introduit des motifs non-soi dans l'organisme. De même, les cellules infectées par un tel vecteur et exprimant de ce fait un gène thérapeutique exogène deviennent des éléments soi-altérés. Il est donc normal que le système immunitaire réagisse contre ces vecteurs et cellules infectées comme s'il s'agissait de corps étrangers. Cette réponse immunitaire contre les cellules infectées constitue un obstacle majeur au développement de ces vecteurs viraux puisque (i) en induisant une destruction des cellules infectées elle limite la durée d'expression du gène thérapeutique et donc l'effet thérapeutique, (ii) elle induit parallèlement une réponse inflammatoire importante, et (iii) elle entraîne l'élimination rapide des cellules infectées après des injections répétées. Ainsi, l'expression de la β -galactosidase codée par un adénovirus recombinant administré dans le muscle de souris immunocompétentes est réduite à des niveaux minimum 40 jours après l'injection (Kass-Eisler et al., PNAS 90 (1993) 11498). De même, l'expression de gène transférés par des adénovirus dans le foie est significativement réduite après 4 mois (Li et al., Hum. Gene Ther. 4 (1993) 403) et l'expression du facteur IX transféré par adénovirus dans des hépatocytes de chiens hémophiles disparaît 100 jours après l'injection (Kay et al., PNAS 91 (1994) 2353).

Il semble donc que l'exploitation en thérapie génique de vecteurs dérivés des adénovirus implique la possibilité de réduire la réponse immunitaire contre ces vecteurs ou les cellules infectées. Ceci constitue précisément l'objet de la présente invention. La présente invention concerne en effet de nouveaux vecteurs dérivés des adénovirus présentant une immunogénicité très réduite voire supprimée. Les vecteurs

de l'invention sont donc particulièrement appropriés pour des applications de thérapie génique, notamment chez l'homme.

Un premier objet de la présente invention concerne un adénovirus défectif dont le génome comprend un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique et un second ADN recombinant contenant un gène immunoprotecteur.

La présente invention découle en partie de la mise en évidence qu'il est possible d'incorporer plusieurs gènes d'intérêt dans des adénovirus, et d'obtenir une expression importante de ces différents gènes dans les cellules infectées. La présente invention découle également de la construction de vecteurs adénoviraux capables d'incorporer plusieurs gènes thérapeutiques dans des conditions permettant leur expression optimale. Elle découle encore de la mise en évidence que la co-expression, dans la cellule infectée, de certains gènes est capable d'induire un effet immunoprotecteur et ainsi de faire échapper les vecteurs de l'invention et/ou les cellules infectées au système immunitaire. La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux présentant des propriétés immunologiques et thérapeutiques tout à fait avantageuses en vue de leur utilisation en thérapie génique ou cellulaire.

Les ADN recombinants selon la présente invention sont des fragments d'ADN contenant le gène considéré (thérapeutique ou immunoprotecteur) et éventuellement des signaux permettant son expression, construits in vitro puis insérés dans le génome de l'adénovirus. Les ADN recombinants utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être des ADN complémentaires (ADNc), des ADN génomiques (ADNg), ou des constructions hybrides consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Ces ADN peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. De manière particulièrement avantageuse, on utilise des ADNc ou des ADNg.

L'insertion des gènes considérés sous forme d'ADN recombinants selon l'invention offre une plus grande flexibilité dans la construction des adénovirus, et permet un meilleur contrôle de l'expression desdits gènes.

Ainsi, les ADN recombinants (et donc les deux gènes d'intérêt) incorporés dans les vecteurs adénoviraux selon la présente invention peuvent être agencés de différentes manières.

Ils peuvent tout d'abord être insérés en un même site du génome de l'adénovirus, ou en des sites différents, sélectionnés. En particulier, les ADN recombinants peuvent être insérés au moins en partie au niveau des régions E1, E3 et/ou E4 du génome de l'adénovirus, en remplacement ou en supplément de séquences virales.

Ils peuvent ensuite comporter chacun un promoteur transcriptionnel, identique ou différent. Cette configuration permet d'obtenir des niveaux d'expression supérieurs, et offre un meilleur contrôle de l'expression des gènes. Dans ce cas, les deux gènes peuvent être insérés dans la même orientation ou dans les orientations opposées.

Ils peuvent également constituer une entité transcriptionnelle unique. Dans cette configuration, les deux ADN recombinants sont contigus et positionnés de telle sorte que les deux gènes soient sous le contrôle d'un promoteur unique, et donnent lieu à un ARN pré-messager unique. Cette disposition est avantageuse puisqu'elle permet d'utiliser un seul promoteur transcriptionnel.

Enfin, l'emploi d'ADN recombinants selon l'invention permet d'utiliser des promoteurs transcriptionnels de nature différente, et notamment des promoteurs forts ou faibles, régulés ou constitutifs, tissu-spécifiques ou ubiquitaires, etc.

Le choix des signaux d'expression et de la position respective des ADN recombinants est particulièrement important pour obtenir une expression élevée du gène thérapeutique et un effet immunoprotecteur important.

Comme gène thérapeutique utilisable pour la construction des vecteurs de la présente invention, on peut citer tout gène codant pour un produit ayant un effet thérapeutique. Le produit ainsi codé peut être une protéine, un peptide, un ARN, etc.

S'agissant d'un produit protéique, il peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une

activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits protéiques thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, etc.

Comme indiqué plus haut, le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les antisens comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, le gène thérapeutique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212). Dans ce mode de réalisation, aucune réponse immunitaire ne sera générée contre le virus vecteur ou la cellule infectée, mais l'antigène sélectionné sera produit et seul susceptible d'être immunogène.

Les gènes thérapeutiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de

l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Le gène immunoprotecteur utilisé dans le cadre de la présente invention peut être de différents types. Plus préférentiellement, la demanderesse a maintenant montré que l'utilisation d'un gène dont le produit agit sur l'activité du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) ou sur l'activité des cytokines permettait de réduire considérablement, voire de supprimer toute réaction immunitaire à l'encontre du vecteur ou des cellules infectées. Les vecteurs ainsi obtenus sont particulièrement
10 avantageux puisqu'ils possèdent une durée d'action beaucoup plus longue in vivo et donc un effet thérapeutique plus important, qu'ils sont dépourvus d'effet inflammatoire et immunogène, et qu'ils peuvent être utilisés avec un nombre d'injections réduit.

Les cellules présentatrices de l'antigène présentent des peptides antigéniques à leur surface, en association avec des molécules du complexe majeur
15 d'histocompatibilité de classe I (MHC-I). Les récepteurs des cellules T cytotoxiques (CTL) reconnaissent les complexes formés entre lesdites molécules MHC classe I et lesdits peptides antigéniques. Cette reconnaissance induit la mort des cellules par les CTL. La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de co-exprimer dans un vecteur adénoviral un gène thérapeutique et un gène capable d'altérer l'expression des
20 molécules MHC-I, et que cette co-expression produit un effet thérapeutique durable sans réactions immunitaire ou inflammatoire. Parmi les gènes dont le produit agit sur l'activité du complexe majeur d'histocompatibilité, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention des gènes dont le produit inhibe au moins partiellement l'expression des protéines du MHC ou la présentation antigénique. A titre d'exemples préférés, on peut
25 citer certains gènes contenus dans la région E3 de l'adénovirus, le gène ICP47 du virus de l'herpès, ou le gène UL18 du cytomegalovirus.

La région E3 du génome de l'adénovirus contient différentes phases de lecture qui, par épissage alternatif, donnent naissance à des protéines différentes. Parmi celles-ci, la protéine Gp19k (ou E3-19k) est une protéine transmembranaire glycosylée
30 localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Cette protéine comprend un domaine luminal liant les molécules du MHC-I et une extrémité cytoplasmique C-terminale capable de lier les microtubules (ou la tubuline), qui agit pour ancrer la protéine gp19k dans la membrane du RE. Gp19k est ainsi capable

d'empêcher l'expression des molécules MHC-I à la surface des cellules par interaction et séquestration au niveau du RE. Cependant, en l'absence de réplication virale, la protéine gp19k est faiblement exprimée par les adénovirus. Le promoteur natif contient en effet certains éléments de régulation tels que des éléments de liaison de type NF-kB qui limitent les conditions d'expression de cette protéine. Par ailleurs, l'expression de la gp19k est également conditionnée à la réalisation d'un épissage alternatif. L'introduction dans les vecteurs de l'invention d'un ADN recombinant contenant une séquence (ADNc de préférence) codant pour la gp19k permet de contrôler et d'optimiser l'expression de ladite protéine. En particulier, l'emploi de promoteurs constitutifs et la suppression des autres phases de lecture permet d'augmenter fortement l'expression de cette protéine et de s'affranchir de la dépendance vis-à-vis de la réplication virale et la présence d'éléments inducteurs. Ceci permet de manière particulièrement avantageuse de diminuer considérablement la lyse par les CTL des cellules infectées et ainsi d'augmenter et de prolonger la production in vivo du gène thérapeutique. Les exemples de la présente demande décrivent notamment la construction d'un adénovirus déficient portant un ADN recombinant comprenant un gène marqueur sous contrôle du promoteur RSV et un second ADN recombinant portant une séquence codant pour la protéine gp19k sous contrôle du promoteur constitutif RSV (Ad- β gal-gp19k). Les résultats présentés démontrent que les cellules infectées par ce vecteur expriment la β -galactosidase à des niveaux aussi élevés que des cellules infectées par un adénovirus contenant uniquement le gène β -gal. Ceci montre que la présence du second ADN recombinant n'affecte pas les niveaux d'expression du premier. Ensuite les résultats présentés montrent que les cellules infectées par l'adénovirus Ad- β gal-gp19k sont protégées contre la lyse par les CTL, ce qui n'est pas le cas des cellules infectées par un adénovirus Ad- β gal. De plus, la présence du second ADN recombinant dans les vecteurs de l'invention inhibe l'expansion clonale de lymphocytes dirigés contre les cellules infectées. Les vecteurs de l'invention induisent donc une réduction significative de la réponse immunitaire par les CTL contre les cellules infectées.

D'autres protéines codées par la région E3 du génome de l'adénovirus telles que les protéines 10,4k et 14,5k présentent certaines propriétés intéressantes en vue de leur incorporation dans les vecteurs de l'invention.

Le gène ICP47 du virus de l'herpès simplex constitue un autre gène immunoprotecteur particulièrement intéressant au sens de la présente invention. Les

cellules infectées par le virus de l'herpès simplex présentent une résistance à la lyse induite par les CTL. Il a été montré que cette résistance pouvait être conférée par le gène ICP47, qui est capable de réduire l'expression des molécules MHC-I à la surface des cellules. L'incorporation du gène ICP47 dans un ADN recombinant selon
5 l'invention permet également aux virus recombinants de l'invention d'échapper au système immunitaire.

Le gène UL18 du cytomégalo virus constitue un autre exemple préféré de gène immunoprotecteur selon l'invention. Le produit du gène UL18 est capable de lier la B2-microglobuline (Browne et al. Nature 347 (1990) 770). La B2-microglobuline est
10 l'une des chaînes des molécules MHC-I. L'incorporation du gène UL18 dans un ADN recombinant selon l'invention permet ainsi de diminuer le nombre de molécules de B2-microglobuline fonctionnelles dans les cellules infectées par les virus de l'invention, et donc de diminuer les capacités de ces cellules à produire des molécules MHC-I complètes et fonctionnelles. Ce type de construction permet donc de protéger les
15 cellules infectées de la lyse par les CTL.

Comme indiqué ci-avant, le gène immunoprotecteur utilisé dans le cadre de la présente invention est, dans un autre mode de réalisation préféré, un gène dont le produit agit sur l'activité ou les voies de signalisation des cytokines. Les cytokines constituent une famille de protéines sécrétées qui agissent comme des molécules de
20 signalisation pour le système immunitaire. Elles peuvent attirer les cellules de l'immunité, les activer, induire leur prolifération et même agir directement sur les cellules infectées pour les tuer.

Parmi les gènes dont le produit agit sur l'activité ou les voies de signalisation des cytokines, on peut citer les gènes intervenant sur la synthèse des cytokines, ou
25 dont le produit est capable de séquestrer les cytokines, d'antagoniser leur activité ou d'interférer avec les voies de signalisation intercellulaires. A titre d'exemple préférentiels, on peut citer en particulier le gène BCRF1 du virus d'Epstein Barr, les gènes crmA et crmB du virus de cowpox, les gènes B15R et B18R du virus de la vaccine, le gène US28 du cytomégalo virus, les gènes E3-14,7, E3-10,4 et E3-14,5 de
30 l'adénovirus.

Le gène B15R du virus de la vaccine code pour une protéine soluble capable de lier l'interleukine-1B (la forme sécrétée de l'interleukine-1), et ainsi d'empêcher cette cytokine de se lier à ses récepteurs cellulaires. L'interleukine-1 est en effet l'une des

premières cytokines produites en réponse à une agression antigénique, et elle joue un rôle très important dans la signalisation du système immunitaire au début de l'infection. La possibilité d'incorporer le gène B15R dans un vecteur selon l'invention permet avantageusement de réduire l'activité de l'IL-18, notamment sur l'activation des cellules immunitaires, et de ce fait de protéger localement les cellules infectées par les virus de l'invention contre une réponse immunitaire importante. Des gènes homologues au gène B15R peuvent également être utilisés, tel que le gène --- du virus de cowpox.

De la même manière, le gène B18R du virus de la vaccine code pour une protéine homologue au récepteur de l'interleukine-6. Ce gène, ou tout homologue fonctionnel, est également utilisable dans les vecteurs de l'invention pour inhiber la liaison de l'interleukine-6 sur son récepteur cellulaire et ainsi réduire localement la réponse immunitaire.

Toujours de la même façon, le gène crmB du virus de cowpox peut être avantageusement utilisé. Ce gène code en effet pour une protéine sécrétée capable de lier le TNF et d'entrer en compétition avec les récepteurs du TNF à la surface des cellules. Ce gène permet donc, dans les virus de l'invention, de diminuer localement la concentration de TNF actif susceptible de détruire les cellules infectées. D'autres gènes codant pour des protéines capables de lier le TNF et d'inhiber au moins partiellement sa liaison sur ses récepteurs peuvent également être utilisés.

Le gène crmA du virus de cowpox code lui pour une protéine ayant une activité d'inhibiteur de protéases du type spermine, qui est capable d'inhiber la synthèse de l'interleukine-18. Ce gène peut donc être utilisé pour diminuer localement la concentration en interleukine-1 et ainsi réduire le développement de la réponse immunitaire et inflammatoire.

Le gène BCRF1 du virus d'Epstein Barr code pour un analogue de l'interleukine 10. Le produit de ce gène est une cytokine capable de diminuer la réponse immunitaire et de changer sa spécificité, tout en induisant la prolifération des lymphocytes B.

Le gène US28 du cytomégalovirus code pour une protéine homologue au récepteur de la protéine inflammatoire des macrophages 1 α (MIP-1 α). Cette protéine est donc capable d'agir comme compétiteur des récepteurs du MIP, et donc d'inhiber son activité localement.

Le produit des gènes E3-14,7, E3-10,4 et E3-14,5 de l'adénovirus est capable de bloquer la transmission du signal intercellulaire médié par certaines cytokines. Lorsque les cytokines se lient à leur récepteur à la surface d'une cellule infectée, un

signal est transmis au noyau pour induire la mort cellulaire ou stopper la synthèse protéique. C'est le cas en particulier du facteur de nécrose des tumeurs (TNF). L'incorporation des gènes E3-14,7, E3-10,4 et/ou E3-14,5 dans un ADN recombinant selon l'invention en vue de leur expression constitutive ou régulée permet de bloquer la
5 signalisation intercellulaire induite par le TNF, et ainsi de protéger les cellules infectées par les virus recombinants de l'invention des effets toxiques de cette cytokine.

Une inhibition locale et transitoire peut être particulièrement avantageuse. Celle-ci peut être obtenue notamment par le choix des signaux d'expression particuliers (promoteurs cytokine-dépendants par exemple) comme indiqué ci-après.

10 Il est entendu que d'autres gènes homologues ou ayant des propriétés fonctionnelles similaires peuvent être utilisés pour la construction des vecteurs de l'invention. Ces différents gènes peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de
15 séquences obtenues par criblage de banques. En outre, ces différents gènes peuvent être utilisés seuls ou en combinaison(s).

L'un des autres aspects importants de la présente invention concerne le choix des promoteurs transcriptionnels utilisés pour diriger l'expression des gènes. Comme
20 indiqué ci-avant, il peut être particulièrement important d'utiliser un promoteur capable d'exprimer constitutivement le gène placé sous son contrôle. Ceci est le cas par exemple du gène gp19k ou d'un homologue, si l'on souhaite obtenir une immunoprotection importante. En revanche, pour contrôler l'expression d'un gène immunoprotecteur agissant sur l'activité des cytokines, une expression régulée peut être souhaitable. En ce qui concerne l'expression du gène thérapeutique, le choix des
25 signaux d'expression dépend de la nature du produit thérapeutique, de la pathologie concernée et du tissu ciblé.

Les promoteurs utilisables pour la construction des ADN recombinants de l'invention peuvent être les promoteurs qui sont naturellement responsables de l'expression du gène thérapeutique ou immunoprotecteur considéré lorsque ceux-ci
30 sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Cependant, il s'agit préférentiellement de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques), en particulier pour contrôler l'expression du gène immunoprotecteur. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes

eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Par ailleurs, lorsque l'ADN recombinant ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus déficient en aval d'une telle séquence. Un promoteur préféré pour la réalisation des vecteurs de l'invention est constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV). Ce promoteur étant constitutif et fort, permet d'induire une immunoprotection par la gp19k importante. Des promoteurs mammifères peuvent également présenter un grand intérêt, tels que le promoteur des gènes PGK, albumine, etc. Il peut être particulièrement intéressant d'utiliser des promoteurs régulés ou tissu-spécifiques de manière à pouvoir cibler la synthèse des produits thérapeutiques et/ou immunoprotecteurs. En particuliers, pour l'expression d'un gène immunoprotecteur inhibant l'activité des cytokines, il peut être particulièrement avantageux d'utiliser un promoteur inductible pour obtenir un effet localisé. Des promoteurs inductibles sont par exemple des promoteurs induits par des cytokines, de telle sorte que l'effet immunoprotecteur ne se produise qu'en réponse à une réaction immunitaire.

Par ailleurs, l'ADN recombinant peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du gène considéré (thérapeutique ou immunoprotecteur) le cas échéant, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Comme indiqué ci-avant, différentes configurations peuvent être envisagées pour la réalisation des vecteurs de l'invention. Les vecteurs de l'invention peuvent tout d'abord contenir les deux gènes sous forme d'une entité transcriptionnelle unique. Dans cette configuration, les deux ADN recombinants sont contigus, disposés de telle sorte que les deux gènes soient sous le contrôle d'un promoteur unique, et donnent lieu à un ARN pré-messager unique. Cette configuration est intéressante puisqu'elle permet d'utiliser un seul promoteur transcriptionnel pour réguler l'expression des 2 gènes. Par ailleurs, cette entité transcriptionnelle unique peut être incorporée dans le vecteur adénoviral dans les deux orientations possibles.

Avantageusement, les deux ADN recombinants contiennent leur propre promoteur transcriptionnel. Cette configuration permet d'obtenir des niveaux d'expression supérieurs, et offre un meilleur contrôle de l'expression des gènes. Dans ce cas, les deux ADN recombinants peuvent être insérés dans la même orientation ou dans les orientations opposées, dans un même site du génome de l'adénovirus ou en des sites différents.

Préférentiellement, les ADN recombinants sont insérés, au moins en partie, au niveau des régions E1, E3 ou E4 du génome de l'adénovirus. Lorsqu'ils sont insérés en deux sites différents, on préfère dans le cadre de l'invention utiliser les régions E1 et E3 ou E1 et E4. Les exemples montrent en effet que cette organisation permet une expression élevée des deux gènes, sans interférence entre les deux. Avantageusement, les ADN recombinants sont insérés en remplacement de séquences virales.

Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention consiste en un adénovirus défectif comportant un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique et un second ADN recombinant contenant un gène immunoprotecteur, dans lequel les deux ADN recombinants sont insérés au niveau de la région E1.

Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention consiste en un adénovirus défectif comportant un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique, inséré au niveau de la région E1, et un second ADN recombinant contenant un gène immunoprotecteur, inséré au niveau de la région E3.

Comme indiqué ci-avant, les adénovirus de la présente invention sont défectifs, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs selon la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par les gènes thérapeutiques. Le caractère défectif des adénovirus de l'invention est un élément important, puisqu'il assure la non dissémination des vecteurs de l'invention après administration.

Dans un mode de réalisation préféré, les adénovirus de l'invention comprennent les séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et possèdent une délétion de tout ou partie du gène E1.

Les séquences inversées répétées (ITR) constituent l'origine de réplication des adénovirus. Elles sont localisées aux extrémités 3' et 5' du génome viral (Cf figure 1), d'où elles peuvent être isolées aisément selon les techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. La séquence nucléotidique des séquences ITR des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2).
Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence ITR gauche correspond à la région comprenant les nucléotides 1 à 103 du génome.

La séquence d'encapsidation (également désignée séquence Psi) est nécessaire à l'encapsidation de l'ADN viral. Cette région doit donc être présente pour permettre la préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention. La séquence d'encapsidation est localisée dans le génome des adénovirus, entre l'ITR gauche (5') et le gène E1 (Cf figure 1). Elle peut être isolée ou synthétisée artificiellement par les techniques classiques de biologie moléculaire. La séquence nucléotidiques de la séquence d'encapsidation des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence d'encapsidation correspond à la région comprenant les nucléotides 194 à 358 du génome.

Plus préférentiellement, les adénovirus de l'invention comprennent les séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et possèdent une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E4.

Dans un mode particulièrement préféré de réalisation, le génome des adénovirus selon l'invention est délété de tout ou partie des gènes E1, E3 et E4, et, encore plus préférentiellement, de tout ou partie des gènes E1, E3, L5 et E4.

Les adénovirus de l'invention peuvent être préparés à partir d'adénovirus d'origines diverses. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Ainsi, les enseignements décrits dans la présente demande peuvent être aisément reproduits par l'homme du métier pour tout type d'adénovirus.

Plus particulièrement, les adénovirus de l'invention peuvent être d'origine humaine, animale, ou mixte (humaine et animale).

Concernant les adénovirus d'origine humaine, on préfère utiliser ceux classés dans le groupe C. Plus préférentiellement, parmi les différents sérotypes d'adénovirus humain, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

Comme indiqué plus haut, les adénovirus de l'invention peuvent également être d'origine animale, ou comporter des séquences issues d'adénovirus d'origine animale. La demanderesse a en effet montré que les adénovirus d'origine animale sont capables d'infecter avec une grande efficacité les cellules humaines, et qu'ils sont incapables de se propager dans les cellules humaines dans lesquelles ils ont été testés (Cf demande FR 93 05954). La demanderesse a également montré que les adénovirus d'origine animale ne sont nullement trans-complémentés par des adénovirus d'origine humaine, ce qui élimine tout risque de recombinaison et de propagation in vivo, en présence d'un adénovirus humain, pouvant conduire à la formation d'une particule infectieuse. L'utilisation d'adénovirus ou de régions d'adénovirus d'origine animale est donc particulièrement avantageuse puisque les risques inhérents à l'utilisation de virus comme vecteurs en thérapie génique sont encore plus faibles.

Les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). Plus particulièrement, parmi les adénovirus aviaires, on peut citer les sérotypes 1 à 10 accessibles à l'ATCC, comme par exemple les souches Phelps (ATCC VR-432), Fontes (ATCC VR-280), P7-A (ATCC VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828), J2-A (ATCC VR-829), T8-A (ATCC VR-830), K-11 (ATCC VR-921) ou encore les souches référencées ATCC VR-831 à 835. Parmi les adénovirus bovins, on peut utiliser les différents sérotypes connus, et notamment ceux disponibles à l'ATCC (types 1 à 8) sous les références ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 et 769. On peut également citer les adénovirus murins FL (ATCC VR-550) et E20308 (ATCC VR-528), l'adénovirus ovin type 5 (ATCC VR-1343), ou type 6 (ATCC VR-1340); l'adénovirus porcin 5359), ou les adénovirus simiens tels que notamment les adénovirus référencée à l'ATCC sous les numéros VR-591-594, 941-943, 195-203, etc.

De préférence, parmi les différents adénovirus d'origine animale, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus ou des régions d'adénovirus d'origine

canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. Les adénovirus canins ont fait l'objet de nombreuses études structurales. Ainsi, des cartes de restriction complètes des adénovirus CAV1 et CAV2 ont été décrites dans l'art antérieur (Spibey et al., J. Gen. Virol. 70 (1989) 165), et les gènes E1a, E3 ainsi que les séquences ITR ont été clonés et séquencés (voir notamment Spibey et al., Virus Res. 14 (1989) 241; Linné, Virus Res. 23 (1992) 119, WO 91/11525).

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés de différentes façons.

Une première méthode consiste à transfecter l'ADN du virus recombinant défectif préparé in vitro (soit par ligature, soit sous forme de plasmide) dans une lignée cellulaire compétente, c'est-à-dire portant en trans toutes les fonctions nécessaires à la complémentation du virus défectif. Ces fonctions sont préférentiellement intégrées dans le génome de la cellule, ce qui permet d'éviter les risques de recombinaison, et confère une stabilité accrue à la lignée cellulaire.

Une seconde approche consiste à co-transfecter dans une lignée cellulaire appropriée l'ADN du virus recombinant défectif préparé in vitro (soit par ligature, soit sous forme de plasmide) et l'ADN d'un virus helper. Selon cette méthode, il n'est pas nécessaire de disposer d'une lignée cellulaire compétente capable de compléter toutes les fonctions défectives de l'adénovirus recombinant. Une partie de ces fonctions est en effet complémentée par le virus helper. Ce virus helper doit lui-même être défectif et la lignée cellulaire porte en trans les fonctions nécessaires à sa complémentation. Parmi les lignées cellulaires utilisables notamment dans le cadre de cette seconde approche, on peut citer notamment la lignée de rein embryonnaire humain 293, les cellules KB, les cellules Hela, MDCK, GHK, etc (Cf exemples).

Ensuite, les vecteurs qui se sont multipliés sont récupérés, purifiés et amplifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

Selon une variante de mise en oeuvre, il est possible de préparer in vitro, soit par ligature, soit sous forme de plasmide, l'ADN du virus recombinant défectif portant les délétions appropriées et les deux ADN recombinants. Comme indiqué ci-avant, les vecteurs de l'invention possèdent avantageusement une délétion de tout ou partie de certains gènes viraux, notamment des gènes E1, E3, E4 et/ou L5. Cette délétion peut correspondre à tout type de suppression affectant le gène considéré. Il peut s'agir notamment de la suppression de tout ou partie de la région codante dudit gène, et/ou

de tout ou partie de la région promotrice de la transcription dudit gène. La suppression est généralement réalisée sur l'ADN du virus recombinant défectif, par exemple par digestion au moyen d'enzymes de restriction appropriées, puis ligature, selon les techniques de biologie moléculaire, ainsi qu'illustré dans les exemples. Les ADN recombinants peuvent ensuite être insérés dans cet ADN par clivage enzymatique puis ligature, au niveau des régions sélectionnées et dans l'orientation choisie.

L'ADN ainsi obtenu, qui porte donc les délétions appropriées et les deux ADN recombinants, permet de générer directement l'adénovirus recombinant défectif portant lesdites délétions et ADN recombinants. Cette première variante est particulièrement adaptée à la réalisation d'adénovirus recombinants dans lesquels les gènes sont disposés sous forme d'une unité transcriptionnelle unique ou, sous contrôle de promoteurs séparés mais insérés en un même site du génome.

Il est également possible de préparer le virus recombinant en deux étapes, permettant l'introduction successive des deux ADN recombinants. Ainsi, l'ADN d'un premier virus recombinant portant les délétions appropriées (ou une partie desdites délétions) et un des ADN recombinants est construit, par ligature ou sous forme de plasmide. Cet ADN est ensuite utilisé pour générer un premier virus recombinant portant lesdites délétions et un ADN recombinant. L'ADN de ce premier virus est ensuite isolé et co-transfecté avec un second plasmide ou l'ADN d'un second virus recombinant défectif portant le deuxième ADN recombinant, les délétions appropriées (partie non présente sur le premier virus), et une région permettant la recombinaison homologue. Cette deuxième étape génère ainsi le virus recombinant défectif portant les deux ADN recombinants. Cette variante de préparation est particulièrement appropriée pour la préparation de virus recombinants portant deux ADN recombinants insérés en deux régions différentes du génome de l'adénovirus.

La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus défectifs tels que décrits précédemment. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de

sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

5 Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de
10 préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 5 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

15 Les adénovirus de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies. Selon le gène thérapeutique inséré, les adénovirus de l'invention peuvent être utilisés notamment pour le traitement ou la prévention des maladies génétiques (dystrophie, fibrose kystique, etc), des maladies neurodégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), des pathologies
20 hyperprolifératives (cancers, resténose, etc), des pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéïnémies, des pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

25 Légende des figures

Figure 1 : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5. La séquence complète de l'Ad5 est disponible sur base de données et permet à l'homme du métier de sélectionner ou de créer tout site de restriction, et ainsi d'isoler toute région du génome.

Figure 2 : Carte de restriction de l'adénovirus CAV2 souche Manhattan (d'après
30 Spibey et al précité).

Figure 3 : Construction du vecteur pAD5-gp19k- β gal.

Figure 4 : Construction de l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3.

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Lignées cellulaires utilisées

Dans les exemples qui suivent, les lignées cellulaires suivantes ont ou peuvent être utilisées :

- 5 - Lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12 %).
- Lignée de cellules humaines KB : Issue d'un carcinome épidermique humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL17) ainsi que les conditions permettant sa culture.
- 10 - Lignée de cellules humaines Hela : Issue d'un carcinome de l'épithélium humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL2) ainsi que les conditions permettant sa culture.
- Lignée de cellules canines MDCK : Les conditions de culture des cellules MDCK ont été décrites notamment par Macatney et al., Science 44 (1988) 9.
- 15 - Lignée de cellules gm DBP6 (Brough et al., Virology 190 (1992) 624). Cette lignée est constituée de cellules Hela portant le gène E2 d'adénovirus sous le contrôle du LTR de MMTV.

EXEMPLES

- 20 **Exemple 1.** Construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant un gène thérapeutique (le gène LacZ de E. coli) sous le contrôle du promoteur du LTR du RSV et le gène gp19k sous le contrôle du promoteur du LTR du RSV, tous deux insérés au niveau de la région E1.

25 Ces adénovirus ont été construits par recombinaison homologue entre un plasmide portant la partie gauche de l'adénovirus Ad5, les deux ADN recombinants et une région de l'adénovirus Ad5 (correspondant à la protéine IX) et l'ADN d'un adénovirus défectif portant différentes délétions.

1. Construction du vecteur pAD5-gp19k-Bgal (figure 3)

1.1. Construction du plasmide pGEM-gp19k

- 30 Le plasmide pAD5-gp19k-Bgal contient une séquence d'ADNc codant pour la protéine gp19k d'adénovirus. Ce plasmide a été construit comme suit. Le fragment XbaI du génome de l'adénovirus Ad5 sauvage contenant la région E3 a été isolé et

cloné au site correspondant du plasmide pGEM (Promega) pour générer le plasmide pGEM-E3. Le fragment *Hinf*I contenant la séquence codante de la gp19k (nucléotides 28628 à 29634 de l'adénovirus Ad5 sauvage) a ensuite été isolé à partir du plasmide pGEM-E3. Les extrémités de ce fragment ont été rendues franches par action du
5 fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'E. coli (Cf techniques générales de biologie moléculaire), puis le fragment obtenu a été cloné au site *Sma*I du plasmide pGEMzf+ (Promega).

Le plasmide obtenu a été désigné pGEM-gp19k (figure 3).

10 1.2. Construction du vecteur pAD5-gp19k- β gal

Cet exemple décrit la construction d'un plasmide contenant un les deux ADN recombinants comprenant leur propre promoteur, la partie gauche du génome de l'adénovirus et une partie supplémentaire (protéine pIX) permettant la recombinaison
15 homologue. Ce vecteur a été construit à partir du plasmide pAd.RSV β Gal comme suit.

Le plasmide pAd.RSV β Gal contient, dans l'orientation 5'→3',

- le fragment *Pvu*II correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et
20 l'amplificateur E1A;
- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),
- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324. Le
25 plasmide pAd.RSV β Gal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

Le plasmide pAd.RSV β Gal a tout d'abord été coupé par les enzymes *Eag*I et *Cla*I. Ceci génère un premier fragment portant notamment la partie gauche de
30 l'adénovirus Ad5 et le promoteur du LTR du RSV. Parallèlement, le plasmide pAd.RSV β Gal a également été coupé par les enzymes *Eag*I et *Xba*I. Ceci génère un deuxième type de fragment portant notamment le promoteur du LTR du RSV, le gène *LacZ*, et un fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue. Les fragments *Cla*I-*Eag*I et *Eag*I-*Xba*I ont ensuite été ligaturés en
35 présence du fragment *Xba*I-*Cla*I du plasmide pGEM-gp19k (exemple 1.1) portant la

séquence codante de la gp19k (Cf figure 3). Le vecteur ainsi obtenu, désigné pAD5-gp19k- β gal, contient donc

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;
- la séquence codant pour la gp19k sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous);
- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous), et,
- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue.

2. Construction des adénovirus recombinants

- 2.1. Construction d'un adénovirus recombinant délété dans la région E1, portant les deux ADN recombinants insérés dans la même orientation, au niveau de la région E1.

Le vecteur pAD5-gp19k- β gal a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient dans le gène E1, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1 est obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus Ad-RSV β gal (Cf Stratford-Perricaudet et al citée plus haut) et le vecteur pAD5-gp19k- β gal, selon le protocole suivant : le plasmide pAD5-gp19k- β gal, linéarisé par XmnI, et l'adénovirus Ad-RSV β gal, linéarisé par l'enzyme ClaI, sont co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont ensuite sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1 peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

2.2. Construction d'un adénovirus recombinant délété dans les régions E1 et E3, portant les deux ADN recombinants insérés dans la même orientation, au niveau de la région E1 (figure 4).

Le vecteur pAD5-gp19k- β gal a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient dans les gènes E1 et E3, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3 a été obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pAD5-gp19k- β gal, selon le protocole suivant :
le plasmide pAD5-gp19k- β gal et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont ensuite été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). Le génome de l'adénovirus recombinant a ensuite été vérifié par analyse en southern blot. L'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3 peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 2 : Mise en évidence en culture cellulaire de la fonctionnalité des adénovirus de l'invention

1. Transcription de la gp19k dans les fibroblastes 3T3.

L'apparition de transcrits codant pour la gp19k dans les cellules infectées par l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3 a été démontrée par analyse en Northern blot des ARN cellulaires totaux. Pour cela, $5 \cdot 10^6$ cellules 3T3 ont été infectées avec 40 pfu/cellule de virus. Au bout de 36 heures, les ARN cellulaires totaux ont été récupérés au moyen de RNazol (Cinna/Biotech), précipités puis resuspendus dans de l'eau. 10 μg ont ensuite été déposés sur gel de formaldéhyde contenant 1,5% d'agarose. Les ARN ont ensuite été dénaturés en présence de NaOH 0,05M, puis transférés sur un support de nylon (Hybond+ Amersham) par transfert capillaire avec

20xSSC. La membrane de nylon a été pré-hybridée en milieu 6xSSC, 5x Denhardt's, 0,5% SDS, 100 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé pendant 2 h à 60 °C. Une sonde correspondant à l'ADN de la région E3 de l'adénovirus Ad5 marquée au ³²P en utilisant le kit MegaPrime (Amersham) a ensuite été ajoutée à la solution et laissée
5 pour l'hybridation pendant toute la nuit. Après l'hybridation, la membrane a été lavée deux fois dans un milieu 2x SSC, 0,1% SDS à température ambiante, puis deux fois dans un milieu 0,1x SSC, 0,5% SDS à 45°C, puis enfin dans un milieu 0,1x SSC à température ambiante et exposée.

Les résultats obtenus montrent l'apparition d'une bande de 1,6 kb dans les
10 cellules infectées par l'adénovirus Ad-gp19k-βgal,ΔE1,ΔE3. Cette bande correspond à un ARNm comprenant la séquence codant pour la gp19k et allant jusqu'au site polyA situé dans le promoteur RSV contrôlant la transcription du gène LacZ. En revanche, aucune bande équivalente n'est détectée dans les cellules infectées par l'adénovirus Ad-βgal.

15

2. Expression d'une gp19k fonctionnelle

La fonctionnalité de la gp19k produite par les cellules infectées par l'adénovirus Ad-gp19k-βgal,ΔE1,ΔE3 a été vérifiée par mesure, en test ELISA, de
20 l'expression de la β2-microglobuline à la surface des cellules. La β2-microglobuline est une protéine non-transmembranaire localisée à la surface des cellules en association avec les molécules MHC-I, et qui est nécessaire à la présentation de l'antigène à la surface des cellules. En particulier, elle est nécessaire pour le repliement correct des molécules MHC-I et pour la présentation des peptides antigéniques à la surface des
25 cellules, et constitue de ce fait un bon marqueur de la fonctionnalité des molécules MHC-I.

Les cellules 3T3-Balb-c à confluence ont été infectées avec 200 pfu/cellule d'Ad-gp19k-βgal,ΔE1,ΔE3, puis incubées 40 h à 37°C, sous atmosphère humide, 5% CO₂, dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules ont
30 ensuite été récoltées dans un tampon PBS 20mM EDTA, et mises en suspension dans du milieu DMEM 10% SVF. 10⁵ cellules sont ensuite introduites dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Les plaques sont centrifugées à 250 g pendant 3 min puis incubées 6 heures. Les puits sont ensuite lavés avec du tampon PBS 1% albumine de boeuf (SAB) puis incubées avec une dilution au 500ème d'anticorps de mouton anti-
35 β2-microglobuline (The Binding Site, Birmingham, UK) dans 1% SAB-PBS pendant

20 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées dans 1% SAB-PBS puis fixées dans un tampon PBS 0,37% formaldéhyde, 0,2% glutaraldéhyde, lavées 2 fois et incubées avec une dilution au 35 000ème dans 1% SAB-PBS d'un 2ème anticorps anti-mouton conjugué à la phosphatase alcaline (PA) (Sigma) pendant 1 heure à 4°C. Les plaques
5 sont ensuite lavées 3 fois dans 1% SAB-PBS. L'activité PA a ensuite été détectée en utilisant le kit PA substrat (Biorad). La densité optique des puits lue à 450 nm, la DO moyenne et l'écart type ont été calculés.

Les résultats obtenus montrent que l'infection par l'Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3 induit une réduction de 40% environ de l'intensité du signal β 2-microglobuline de surface révélé par le test ELISA, par rapport à l'effet produit par l'adénovirus Ad- β gal.
10 Ces résultats indiquent clairement que l'Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3 induit la production d'une protéine gp19k fonctionnelle, et que celle-ci induit une baisse significative de l'expression des molécules MHC-I à la surface des cellules.

15 Exemple 3. Effet immunoprotecteur des adénovirus de l'invention

3.1. Sensibilité aux CTL stimulés in vivo par l'adénovirus Ad- β gal

Cet exemple montre que les cellules infectées par l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3 sont protégées de la lyse par les CTL par rapport aux cellules infectées
20 par un adénovirus Ad- β gal.

Des souris DBA/2 (H-2d) ont reçu une première injection intraveineuse de 10^8 pfu de virus Ad- β gal, suivie, 3 semaines après, d'une nouvelle injection intrapéritonéale de la même quantité de virus. Les souris ont été sacrifiées 2 semaines après (au plus tôt), leur rate broyée et les cellules de la rate sont mises en suspension
25 dans 10ml de RPMI 1640 (Gibco) contenant 10% de SFV décomplémentisé, 50 μ g/ml de streptomycine, 100 U/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de kanamycine et 100 μ g/ml de gentamycine. Les cellules ainsi obtenues (lymphocytes CTL) ont alors été incubées en présence de cellules 3T3 infectées par l'adénovirus Ad- β gal. Ceci conduit à une lyse de 40% environ des cellules colorées (i.e. infectées). En revanche, ces mêmes cellules
30 (lymphocytes CTL) n'ont pratiquement aucun effet sur les fibroblastes non infectés ni sur les fibroblastes infectés par l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3. Ces résultats montrent bien que l'incorporation dans les vecteurs de l'invention d'un ADN recombinant capable de produire la gp19k induit une immunoprotection des cellules infectées.

3.2. Sensibilité aux CTL stimulés in vivo par l'adénovirus Ad-gp19k- Bg_{al}ΔE1ΔE3

Cet exemple montre que les cellules infectées par l'adénovirus Ad-gp19k-
Bg_{al}ΔE1ΔE3 sont protégées de la lyse par les CTL par rapport aux cellules infectées
5 par un adénovirus Ad-Bg_{al}.

Les cellules de la rate de souris ayant reçu des injections d'Ad-gp19k-
Bg_{al}ΔE1ΔE3 ont été préparées dans les conditions décrites ci-dessus. Dans les
conditions décrites ci-dessus, ces CTL stimulés en présence de cellules 3T3 infectées
10 par Ad-gp19k-Bg_{al}ΔE1ΔE3 n'induisent pas de lyse desdites cellules, ni des
fibroblastes non-infectés, ni des fibroblastes infectés par l'Ad-Bg_{al}. Par ailleurs, il a été
vérifié que cette absence de lyse n'était pas due à une faible viabilité des cellules. Pour
cela, les mêmes lymphocytes ont été stimulés ensuite en présence de cellules 3T3
infectées par l'Ad-Bg_{al}, dans le but d'amplifier tous les clones anti-Bg_{al} ou anti
15 adénovirus. Les lymphocytes ainsi obtenus sont capables de lyser les cellules 3T3
infectées par l'Ad-Bg_{al}, de la même manière que ceux prélevés des souris ayant reçu
l'Ad-Bg_{al}. Ces résultats montrent clairement (i) que les vecteurs de l'invention
induisent une immunoprotection des cellules infectées, puisqu'aucun CTL spécifique
efficace n'est généré, et (ii), que si certains lymphocytes anti-vecteur sont générés dans
20 les rates de souris injectées par Ad-gp19k-Bg_{al}ΔE1ΔE3, l'expression des antigènes
pendant la stimulation ex vivo est insuffisante pour induire une expansion clonale de
ces lymphocytes nécessaire à la lyse des cellules cibles infectées.

**Exemple 3. Construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant un
gène thérapeutique sous le contrôle d'un promoteur inséré au niveau de la région
E1 et le gène gp19k sous le contrôle du promoteur du LTR du RSV inséré au
niveau de la région E3.**
25

Ces adénovirus ont été construits par recombinaison homologue entre un
l'ADN d'un premier virus défectif portant le premier ADN recombinant (gène
thérapeutique + promoteur) inséré au niveau de la région E1 et l'ADN d'un deuxième
30 adénovirus défectif portant le deuxième ADN recombinant (gp19k + promoteur RSV)
inséré au niveau de la région E3.

1. Construction du virus défectif portant le deuxième ADN recombinant
(gp19k + promoteur RSV) inséré au niveau de la région E3

Ce virus a été construit à partir de l'adénovirus Add1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543). Ce virus porte une délétion au niveau de la région E1 et au niveau de la région E3 (fragment XbaI-EcoRI délété). L'ADN du virus Add1324 a été isolé et purifié. Cet ADN est ensuite coupé par les enzymes XbaI et EcoRI. Un
5 fragment XbaI-EcoRI est ensuite issu du plasmide pAd-gp19k-Bgal portant la séquence codant pour la gp19k sous contrôle du promoteur RSV, puis inséré au niveau des sites dans l'ADN de Add1324 ouvert comme précédemment.

L'ADN ainsi obtenu comporte donc une délétion au niveau de la région E1 et
10 un ADN recombinant au niveau de la région E3 portant le gène gp19k sous contrôle du RSV.

2. Construction des adénovirus portant les deux ADN recombinants.

L'ADN du virus recombinant préparé ci-dessus et l'ADN d'un adénovirus
15 recombinant portant un gène thérapeutique au niveau de la région E1, linéarisé par BamHI, sont co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologe. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont ensuite été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui
20 conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456).

25

Bien que les exemples ci-dessus décrivent plus particulièrement l'emploi du gène gp19k, il est entendu que les approches décrites dans les exemples ci-dessus peuvent être répétées par l'homme du métier en utilisant d'autres gènes thérapeutiques, d'autres gènes immunoprotecteurs, d'autres promoteurs et d'autres sites d'insertion
30 dans le génome de l'adénovirus.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus défectif dont le génome comprend un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique et un second ADN recombinant
5 contenant un gène immunoprotecteur.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que les deux ADN recombinants constituent une entité transcriptionnelle unique.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que les deux ADN
10 recombinants comportent chacun un promoteur transcriptionnel, identique ou différent.
4. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce que les deux ADN recombinants sont insérés dans la même orientation.
5. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce que les deux ADN
15 recombinants sont insérés dans les orientations opposées.
6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que les
deux ADN recombinants sont insérés dans un même site du génome, de préférence au
niveau des régions E1, E3 ou E4.
- 20 7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce que les deux ADN
recombinants sont insérés au niveau de la région E1.
8. Adénovirus selon l'une des revendications 1, 3, 4 et 5 caractérisé en ce que
les deux ADN recombinants sont insérés en des sites différents du génome.
25
9. Adénovirus selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'un des ADN
recombinants est inséré au niveau de la région E1 et l'autre au niveau de la région E3
ou E4.
- 30 10. Adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 9
caractérisé en ce qu'il comprend les séquences ITR, une séquence permettant
l'encapsidation, et en ce qu'il porte une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E4.

11. Adénovirus selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, et en ce qu'il porte une délétion de tout ou partie des gènes E1, E3 et E4.

12. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce que son
5 génome est délété de tout ou partie des gènes E1, E3, L5 et E4.

13. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est d'origine humaine, animale, ou mixte.

14. Adénovirus selon la revendication 13 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine humaine sont choisis parmi ceux classés dans le groupe C, de préférence
10 parmi les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

15. Adénovirus selon la revendication 13 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine animale sont choisis parmi les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, ovine, porcine, aviaire et simienne.

16. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que le gène
15 thérapeutique code pour une protéine thérapeutique.

17. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que le gène
20 thérapeutique code pour un ARN thérapeutique.

18. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que le gène immunoprotecteur est un gène dont le produit agit sur l'activité du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) ou sur l'activité des cytokines.

19. Adénovirus selon la revendication 18 caractérisé en ce que le gène
25 immunoprotecteur est un gène dont le produit inhibe au moins partiellement l'expression des protéines du MHC ou la présentation antigénique.

20. Adénovirus selon la revendication 19 caractérisé en ce que le gène immunoprotecteur est choisi parmi le gène de la gp19k de l'adénovirus, le gène ICP47
30 du virus de l'herpès, ou le gène UL18 du cytomégalovirus.

21. Adénovirus selon la revendication 18 caractérisé en ce que le gène dont le produit agit sur l'activité des cytokines est choisi parmi le gène BCRF1 du virus d'Epstein Barr, les gènes crmA et crmB du virus de cowpox, les gènes B15R et B18R du virus de la vaccine, le gène US28 du cytomégalovirus et les gènes E3-14,7, E3-10,4 et E3-14,5 de l'adénovirus.

22. Adénovirus défectif caractérisé en ce qu'il comprend un premier ADN recombinant comprenant un gène thérapeutique et un deuxième ADN recombinant comprenant le gène codant pour la gp19k, tous deux insérés au niveau de la région E1 du génome de l'adénovirus.

23. Adénovirus selon les revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que le ou les promoteurs transcriptionnels sont choisis parmi les promoteurs mammifères, eucaryotes ou viraux.

24. Adénovirus selon la revendication 23 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, PGK, albumine, et les promoteurs induits par des cytokines.

25. Composition pharmaceutique comprenant au moins un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 24.

26. Composition pharmaceutique selon la revendication 25 comprenant un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

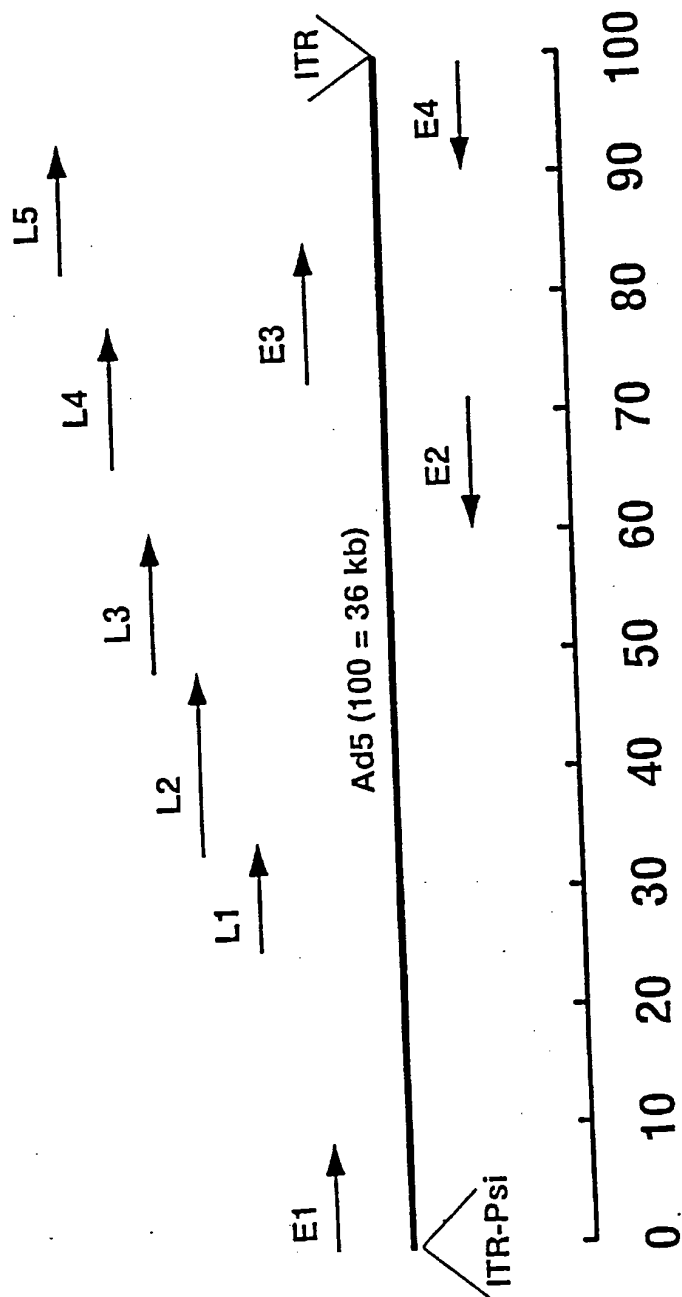


Figure 1

2/4

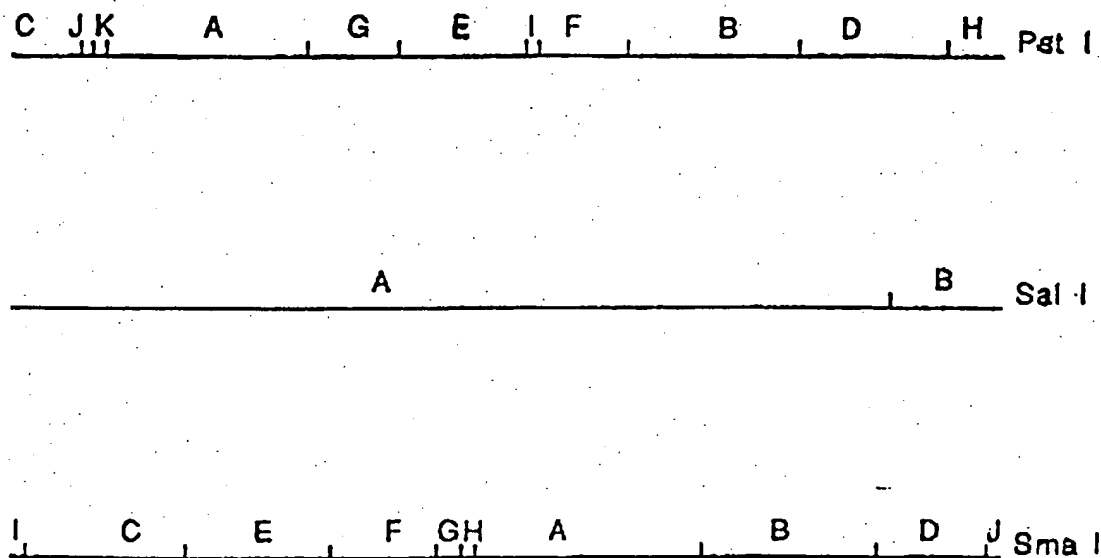
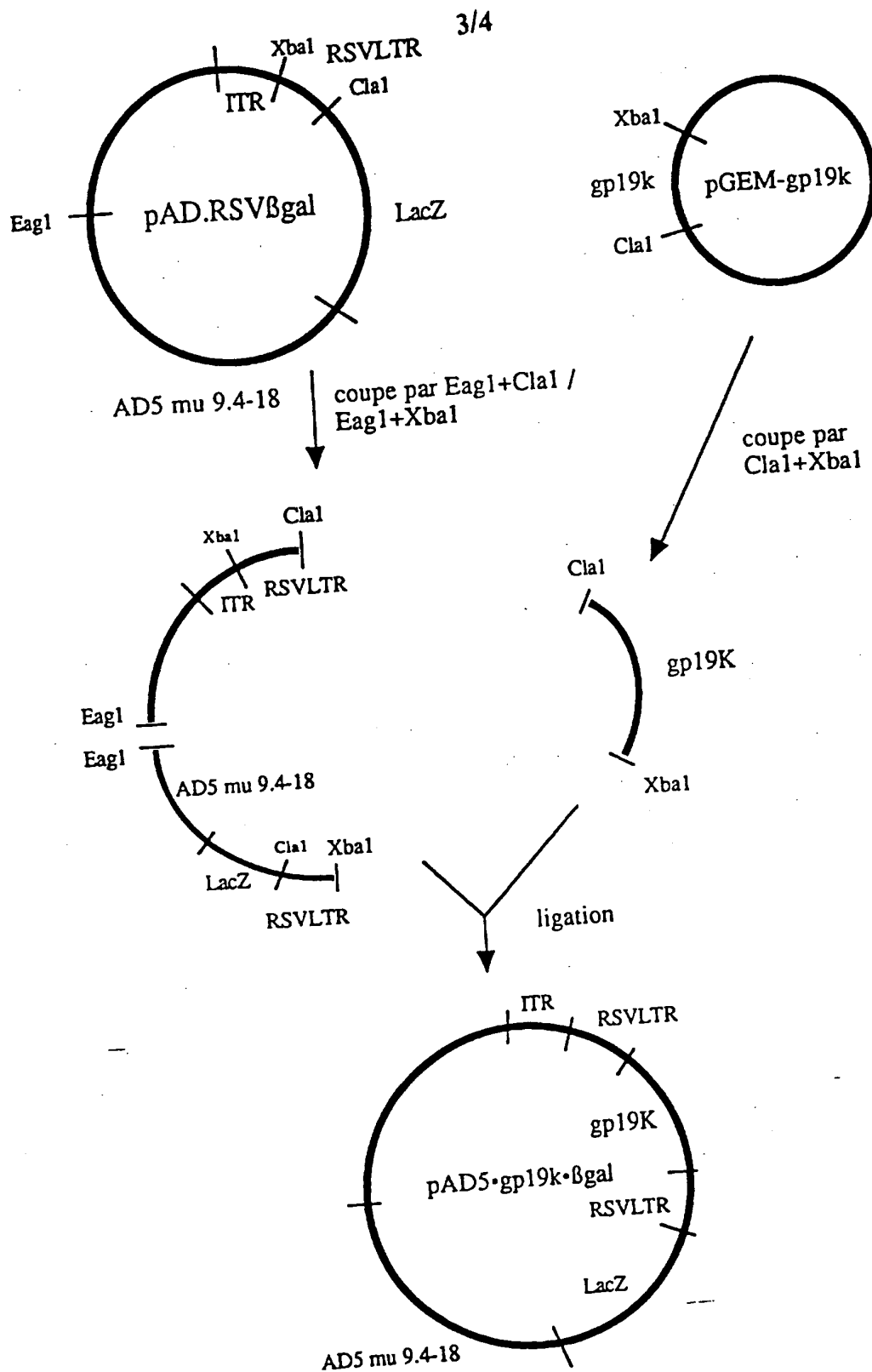


Figure 2



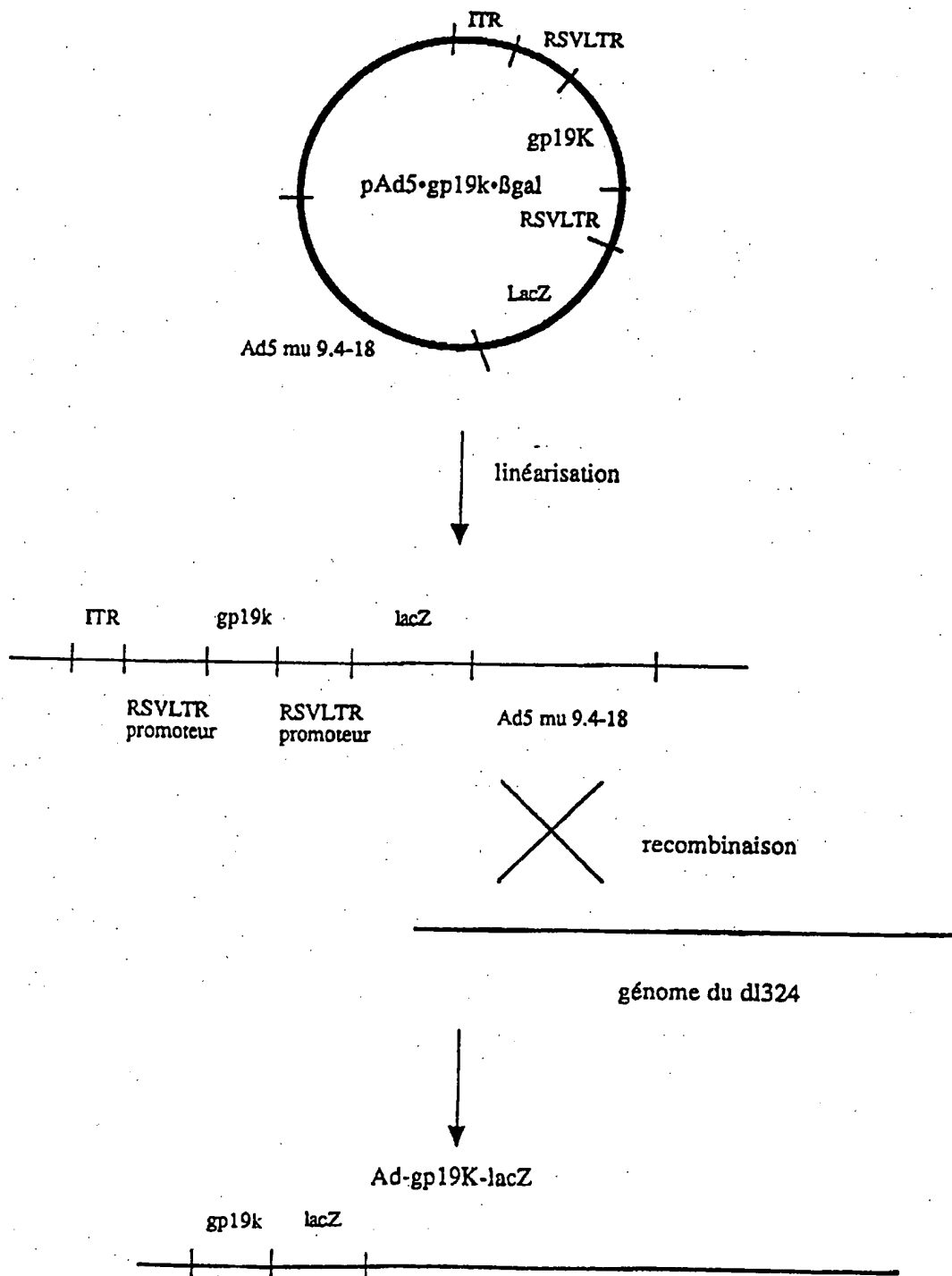


Figure 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 A61K48/00

C07K14/075 A61K39/235 C12N7/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 4, April 1993 pages 2159-2167, RANHEIM, T.S. ET AL. 'Characterization of mutants within the gene for the adenovirus E3 14.7-kilodalton protein which prevents cytolysis by Tumor Necrosis Factor' see the whole document ---	1, 18, 21
A	WO,A,93 19191 (CNRS INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 September 1993 see the whole document ---	1
A	WO,A,94 04196 (IMPERIAL CANCER RESEARCH) 3 March 1994 see page 17, line 1 - page 20, line 30; claims 1,2,14-17,26,27 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 January 1996

Date of mailing of the international search report

29.02.96

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/FR 95/01326

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 06867 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15 April 1993 see claims ---	1
P,X	WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 December 1994 see claims 11,12 ---	1-26
P,X	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, January 1995 pages 31-44, KREMER, E.J. & PERRICAUDET, M. 'Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer' see page 34, line 12 - line 13 see page 41, line 24 - line 37 ---	1-26
P,X	GENE THERAPY, vol. 2, no. 4, June 1995 pages 256-262, LEE, M.G. ET AL. 'The constitutive expression of the immunomodulatory gp19k protein in E1-, E3- adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector' see the whole document -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/FR 95/01326

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A- 2688514	17-09-93
		AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
WO-A-9404196	03-03-94	NONE	
WO-A-9306867	15-04-93	AU-B- 2777692	03-05-93
		CA-A- 2120503	15-04-93
		EP-A- 0607309	27-07-94
		JP-T- 7502987	30-03-95
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. : Internationale No
PCI/FR 95/01326

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C07K14/075 A61K39/235 C12N7/01

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 4, Avril 1993 pages 2159-2167, RANHEIM, T.S. ET AL. 'Characterization of mutants within the gene for the adenovirus E3 14.7-kilodalton protein which prevents cytolysis by Tumor Necrosis Factor' voir le document en entier ---	1,18,21
A	WO,A,93 19191 (CNRS INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 Septembre 1993 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,94 04196 (IMPERIAL CANCER RESEARCH) 3 Mars 1994 voir page 17, ligne 1 - page 20, ligne 30; revendications 1,2,14-17,26,27 ---	1
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- * "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- * "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- * "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- * "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- * "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- * "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- * "X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- * "Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- * "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 Janvier 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29.02.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem - Internationale No
PCT/FR 95/01326

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,93 06867 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15 Avril 1993 voir revendications ---	1
P,X	WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 Décembre 1994 voir revendications 11,12 ---	1-26
P,X	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, Janvier 1995 pages 31-44, KREMER, E.J. & PERRICAUDET, M. 'Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer' voir page 34, ligne 12 - ligne 13 voir page 41, ligne 24 - ligne 37 ---	1-26
P,X	GENE THERAPY, vol. 2, no. 4, Juin 1995 pages 256-262, LEE, M.G. ET AL. 'The constitutive expression of the immunomodulatory gp19k protein in E1-, E3- adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector' voir le document en entier -----	1-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dev : Internationale No

PC1/FR 95/01326

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A- 2688514	17-09-93
		AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
WO-A-9404196	03-03-94	AUCUN	
WO-A-9306867	15-04-93	AU-B- 2777692	03-05-93
		CA-A- 2120503	15-04-93
		EP-A- 0607309	27-07-94
		JP-T- 7502987	30-03-95
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)